

# 桉树抗枝瘿姬小蜂关联基因的初步筛选研究

王 伟<sup>1</sup>, 徐建民<sup>2</sup>, 李光友<sup>2</sup>, 韩 超<sup>2</sup>, 吴世军<sup>2</sup>, 陆钊华<sup>2</sup>

(1. 广州市园林科学研究所, 广东 广州 510405; 2. 中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广东 广州 510520)

**摘 要:**以高感品系巨细桉“DH201-2”(样品 A)和高抗品系尾叶桉“A107”(样品 B)进行转录组测序,测序结果通过 Denovo 组装、差异表达基因筛选等技术手段筛选出 971 条差异表达基因,1 224 条特异表达基因;对差异基因序列进行 BlastP 分析和抗性基因功能分析,最终选取了 19 个目的基因进行实时荧光定量检测。结果表明:19 个目的基因中,除了基因 G16 扩增异常外,其余 18 个目的基因都获得了较好的特异性扩增,其中,目的基因 G1、G5、G9、G10、G18 和 G19 在样品 B 中的平均表达量显著高于其在样品 A 中的平均表达量,目的基因 G3、G4 和 G11 在样品 A 中的平均表达量显著高于其在样品 B 中的表达量;其余目的基因在 2 个样品中表达量差异不显著。目的基因 G1、G3、G4、G5、G9、G10、G11、G18 和 G19 可能是与桉树抗枝瘿姬小蜂有关联的基因。

**关键词:**桉树枝瘿姬小蜂;抗虫基因;转录组测序;荧光定量

**中图分类号:**S 718 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0088-04

桉树枝瘿姬小蜂(*Leptocybe invasa* Fisher & La Salle)属膜翅目(Hymenoptera)姬小蜂科(Eulophidae), Mendel 等<sup>[1]</sup>于 2000 年在中东和地中海地区发现该虫危害桉树,其危害方式主要是在桉树(*Eucalyptus* spp.)的嫩枝、叶柄和叶片主脉上产卵,形成虫瘿,导致植株矮化并呈丛枝状,对桉树的生长产生严重影响。

林木抗虫机制因树种不同、虫的类型不同而有所不同,通常认为林木的抗性机制是受多个基因控制的,在杨树抗云斑天牛研究中,利用 PAPD 分子标记技术初步筛选出与抗云斑天牛相连锁的分子标记<sup>[2]</sup>。目前已知的抗虫基因根据来源可分为 3 类,第 1 类是由细菌分离出来的抗虫基因;第 2 类是植物组织中分离出来的抗虫基因;第 3 类是由动物体内分离出来的毒素基因。从植物组织中分离出来的抗虫基因主要是外援凝集素基因、蛋白酶抑制剂基因以及淀粉酶抑制剂基因等<sup>[3]</sup>,而根据研究,植物体内起化学防御作用的主要是植物防御酶和次生代谢产物<sup>[4]</sup>。

该研究选取不同抗性桉树品种(高感巨细桉“DH201-2”和高抗尾叶桉“A107”)的叶片进行转录组测序,通过生物信息学分析筛选差异表达基因,同时利用 RT-PCR

检测筛选出基因在 2 个样品中的表达水平,进而筛选出可能与桉树抗枝瘿姬小蜂有关的基因,为开展抗桉树枝瘿姬小蜂基因定位标记及转基因等分子育种奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料分别为高抗品系尾叶桉“A107”(样品 B)和高感品系巨细桉“DH201-2”(样品 A)<sup>[5-6]</sup>的叶片,2011 年 5 月采集新鲜叶片后液氮速冻,并保存于-80℃冰箱备用。

RNA 提取选用 Qiagen 公司提供的 Qiagen Dneasy Plant Mini Kit 试剂盒,反转录反应试剂盒为 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit(TaKaRa),荧光定量试剂盒为 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit(TaKaRa)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取 RNA 提取选用 Qiagen Dneasy Plant Mini Kit 试剂盒使用 Nanodrop 8000 仪检测 RNA 的浓度和纯度。

1.2.2 差异基因的初筛 去除原始数据中的低质量数据,使得后续分析结果更准确可靠。使用 Soapdenovo 软件进行拼接。根据结果,统计表达量值,并进行筛选、统计,使用软件 BWA 和 Cufflinks,Soapdenovo,Samtools 结合自有流程脚本进行后期分析<sup>[7-8]</sup>。使用自有脚本进行表达量分析,得到全转录组表达谱和特异性表达基因,利用 Deseq 软件对分析结果进行差异表达检验,筛选差异表达基因<sup>[9]</sup>。最后将差异基因序列的抽提结果与 NCBI Reference 数据库进行序列比对。

1.2.3 反转录 根据 SYBR® Premix EX Taq™ RT-PCR Kit II 试剂盒说明书配制反应体系。反转录条件为

**第一作者简介:**王伟(1983-),男,山西临汾人,博士研究生,研究方向为观赏植物栽培及育种。E-mail:waynelove@126.com.

**责任作者:**徐建民(1964-),男,博士,研究员,博士生导师,现主要从事林木遗传育种等研究工作。E-mail:jianmxu@163.com.

**基金项目:**国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAD01B0401);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(RIT-FYWZX200904);广州市林业和园林局科研资助项目。

**收稿日期:**2013-09-13

37℃温浴 15 min,然后 85℃加热 5 s。反应完毕后将产物保存在-20℃冰箱备用。

1.2.4 RT-PCR 方法 目的基因引物合成结果及内参基因的选择:利用在线软件 Primer 5 设计荧光定量引物和探针,18sRNA 作为内参基因<sup>[10-11]</sup>。引物由上海英骏生物技术有限公司北京测序部合成(表 1)。取反转录后的 cDNA 样品为模板,用合成的 19 对引物扩增,按照试

剂盒说明配制 PCR 反应体系,根据试剂盒要求在荧光定量仪上设置 RT-PCR 反应条件。荧光定量试验设计:使用 ABI 7500 实时定量 PCR 仪,以“A107”和“DH201-2”叶片提取的 RNA 反转录后的 cDNA 样品作为模板,对筛选的 19 条引物进行扩增(内参基因:18sRNA),检测目的基因在 2 个样品中的相对表达水平,定量分析重复 3 次,每次 4 个样。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 SYBR green primer of PCR

基因 Gene	名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence	基因 Gene	名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence
G1	-F	GTCTCAAGGACGGCAAGTG	G11	-F	ACAGAACAACGAGGCCAAGC
	-R	GCAGAGGAATGAGGCAATCG		-R	GAACGCCTGCCCTGTCTATG
G2	-F	TTCGAGGTCCGAAATGACT	G12	-F	CCCGGGATTTTACACATA
	-R	GGACGATCCTTGCTCTCTCT		-R	AAAGTGTGGGCGGATGAATG
G3	-F	TCCAAAAGCCGGAATAATGA	G13	-F	TTCGAGATGGGACCTCAAT
	-R	GAAGCCCATGGTTTCTGCTG		-R	TCCTGGGATGATCTGTCTGT
G4	-F	CCATCGGTGCTACGACTTC	G14	-F	CGGGTTGGACGAGACTTGAG
	-R	CAACGTCGGGTGACTTCCTC		-R	ATGGTGGCAAGGACAAATG
G5	-F	ACTACCGGGACTTCGTGCTG	G15	-F	GCGAAGGAGCAGATCGAAGA
	-R	GGTAGTTTCTCATTTCATGTTGC		-R	GAATGAGTTCGGAGGCGTTG
G6	-F	GATGCGAAGCCCTAAGCAGA	G16	-F	ACTCGCACTTGAGGCAGGAG
	-R	TGAAGCTCAAGCCCGAGAAG		-R	ACTCGCACTTGAGGCAGGAG
G7	-F	GGGACCCCGTCATTACACAA	G17	-F	ATAATGACCGTGCCGAGCTG
	-R	GGGTCAATCGACCTCCATTCA		-R	CTCCCGGAGCAAAATGACAG
G8	-F	CCCTGGTGAGCTTGATGGAG	G18	-F	TCAAAGCGTTTCCCAACTGC
	-R	CATGGACGACACATGGAGA		-R	TGCTGGTTGGAACGAACTT
G9	-F	GATCATGGTGGGGTTTGTGT	G19	-F	CCATGCCTTCGTCTTTGGTC
	-R	ACCACCACAAAATGGCTTG		-R	GGGAGGGAAGAAGGTGAGGA
G10	-F	CCTGGAGGTGAACAGGAACG	18sRNA	-F	CGCGCTACACTGATGTATTC
	-R	ATGCCAAGGTGAGTCTCTGA		-R	GTACAAAAGGCAGGGACGTA

## 2 结果与分析

### 2.1 桉树品系总 RNA 提取

“A107”和“DH201-2”叶片总 RNA 含量分别为 289.7、271.7 ng/μL,凝胶电泳结果显示条带清晰,且 OD<sub>200</sub>与 OD<sub>280</sub> 比值为 1.91 和 1.88,表明 RNA 质量较好,可用于进行 PCR 反应。

### 2.2 差异基因初筛

使用 Soapdenovo 软件拼接之后,进行差异表达基因筛选,得到结果如表 2 所示。

表 2 基因表达谱分析结果汇总

Table 2 Summary of gene expression profile analysis

类型 Style	差异表达 Differential expression	A 样的特异表达 A Specific expression	B 样的特异表达 B Specific expression
个数 Number	971	642	582

### 2.3 与抗性关联的目的基因

将差异基因序列与 NCBI Reference 数据库进行比对分析,对其结果进行筛选分析,并参考现有文献对抗虫基因来源和相关生物功能的描述,在 BlastP 结果中,根据其相似基因的功能注释,初步筛选了 19 条可能与抗虫有关联的基因,进行 RT-PCR 分析。

### 2.4 目的基因荧光定量分析

#### 2.4.1 荧光定量扩增曲线 内参基因 18sRNA 以及 19

个目的基因在样品 A、B 中的扩增曲线见图 1。从扩增曲线可以看出,除了目的基因 G16 外,其它基因的不同重复在样品中表达均一致。

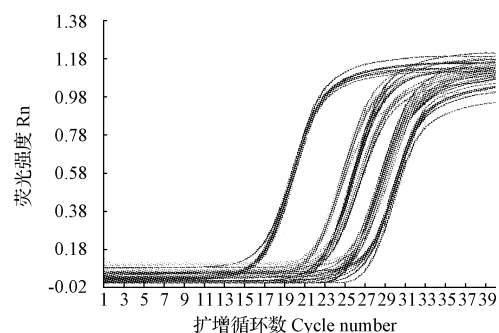


图 1 18sRNA 及 19 个目的基因的扩增曲线

Fig. 1 The amplification curves of 18sRNA and 19 target genes

2.4.2 荧光定量熔解曲线 熔解曲线可用来分析 PCR 反应的扩增特异性,理想的熔解曲线应该是单峰型曲线,如出现 2 个或以上的峰,表明有引物二聚体等非特异性扩增产生<sup>[12]</sup>。从图 2 可以看出,除了基因 G16 外,各目的基因的熔解温度基本保持不变,在其它位置也没出现杂峰,这说明扩增过程不存在明显的引物二聚体或非特异性产物,可由此推断定量 PCR 扩增得到的数据是

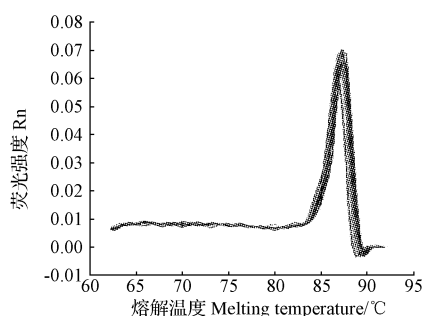


图2 目的基因熔解曲线

Fig. 2 The melting curves of target genes

可靠的,使用的引物和扩增条件基本合适。

2.4.3 目的基因荧光定量分析 对“A107”和“DH201-2”叶片样品进行 RT-PCR 反应,以 18sRNA 作为内参基因,19 个目的基因在 2 个样品中的相对表达量差异见图 3。从图 3 可以看出,目的基因 G1 在样品 B 中平均表达量是其在样品 A 中表达量的 5.85 倍,其主要作用为控制氧化酶的合成,氧化酶是过氧化物酶体中的主要酶类,约占过氧化物酶体总量的一半,而过氧化物酶是与植物抗性有密切关系的酶类<sup>[13-15]</sup>。在该研究中,桉树品系在遭受桉树枝瘿姬小蜂危害后,其叶片内过氧化物酶也发生了显著变化,荧光定量检测结果印证了过氧化物酶与桉树对枝瘿姬小蜂的抗性有密切关系,同时也说明了基因 G1 是与抗性关联的基因片段。此外,目的基因 G3、G4、G5、G9、G10、G11、G17、G18 和 G19 在 2 个样品中的平均表达量均达到差异显著水平,其中,目的基因 G1、G5、G9、G10、G18 和 G19 在样品 B 中的平均表达量显著高于其在样品 A 中的平均表达量,目的基因 G3、G4 和 G11 在 A 样品中的平均表达量显著高于其在样品 B 中的表达量;目的基因 G6、G7、G8、G12、G13、G14 和 G15 在 2 个样品中的平均相对表达量相差不大。

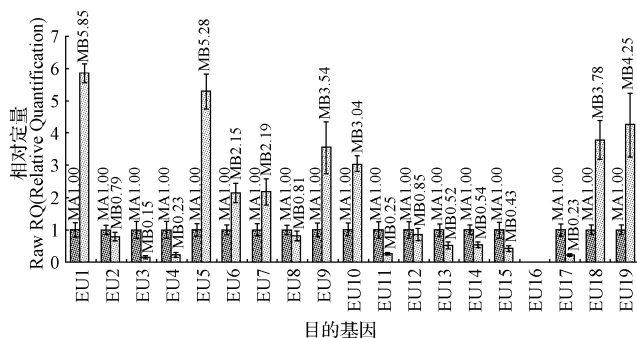


图3 19 条目的基因 RT-PCT 结果

Fig. 3 The RT-PCR result of 19 target gene

### 3 结论与讨论

该研究使用 Qiagen Dneasy Plant Mint Kit 试剂盒抽提桉树叶片 RNA,并根据桉树叶片富含多糖、多酚、多次生代谢产物的特点,在抽提过程中加入去糖试剂,最

终获得了高质量的桉树叶片 RNA。

对高抗品系(尾叶桉“A107”)和高感品系(巨细桉“DH201-2”)2 个品种的叶样测序后,筛选出大量的差异表达基因,根据其在 2 个品种中表达变化倍数,剔除了一些差异较低的基因,同时,结合前人对于植物抗性研究的结论,该试验筛选了 19 个与抗性关联的基因片段进行实时荧光定量检测。

实时荧光定量检测结果表明,19 个目的基因中,除了基因 G16 扩增异常外,其余 18 个目的基因都获得了较好的特异性扩增,其中,目的基因 G1、G5、G9、G10、G18 和 G19 在尾叶桉“A107”中的平均表达量显著高于其在巨细桉“DH201-2”中的平均表达量,目的基因 G3、G4 和 G11 在巨细桉“DH201-2”中的平均表达量显著高于其在尾叶桉“A107”中的表达量。

除了上述目的基因 G1 其功能可能控制氧化酶合成外,目的基因 G3、G4 和 G5 均可能是植物体内与氧化酶和还原酶关联的基因;基因 G9 和 G10 可能与植物体内次生代谢产物合成相关的关联基因。目的基因 G11 可能与中凝集素家族蛋白合成有关联,植物凝集素是一种能够与特异的单糖或多糖化合物可逆集合而不改变其被识别糖基共价结构的非免疫球蛋白。在植物防御、固氮等生理方面具有十分重要地位<sup>[3]</sup>,同时,有研究表明一些植物凝集素基因对害虫有很好的毒杀作用,2003 年 Melander 等将豌豆凝集素用农杆菌介导的叶柄转化法获得转基因油菜,在测试的 20 株转基因植物中,有 11 株花粉甲虫重量显著降低 46%;1999 年 Murdock 等用 17 种凝集素饲喂四纹豆象,发现苋菜凝集素基因使其发育延迟 22.8 d<sup>[3]</sup>。

目的基因 G12、G13 可能是与植物体内次生代谢产物合成有关联的基因,次生代谢产物是植物抗虫的主要生化基础<sup>[16]</sup>,能影响昆虫或其它有机体对食物的选择、摄食和群体生物学,植物体内的次生物质主要有生物碱、萜烯类物质、酚类物质和酯类等。目的基因 G12 可能还与酯类次生代谢产物合成有关,G13 与萜烯类次生代谢产物合成有关。荧光定量检测结果表明,这 2 个基因在 2 个桉树品种中的表达量并未达到显著差异,该项研究前期试验研究了桉树受枝瘿姬小蜂危害前后叶片内黄酮类化合物含量和单宁含量的动态变化,均呈现一定的规律性变化,而桉树叶片中萜烯类物质和酯类物质受害前后的动态变化并未进一步研究,但有研究表明,二萜类化合物、木质素类化合物对昆虫表现出拒食、抑制生长发育和毒杀等多种生物活性,是一类重要的植物源杀虫活性物质<sup>[17-19]</sup>。而在该研究中基因 G12、G13 在 2 个不同抗性的品种中表达量却并未表现出显著差异,究其原因,可能是控制萜烯类化合物和酯类化合物的合成是由多个基因共同作用的。课题组将进一步研究这 2 类化合物在桉树遭受枝瘿姬小蜂危害后,其在叶片中的动态变化规律。



目的基因 G18 可能是与植物体内海藻糖磷酸合酶的合成有关,海藻糖是一种广泛存在于自然界中的非还原性双糖,其与生物体抗旱、耐盐碱和抗低温等逆境的能力有关,实时荧光定量检测结果表明,在不同抗性样品中,其平均表达量达到显著差异水平,说明目的基因 G18 可能是与 2 种桉树表现出不同抗性有关联的基因;目的基因 G19 可能与植物体内 WRKY 蛋白家族的合成有关,各种高等植物当机体受到机械损伤、病原物侵害或者非生物胁迫诱导时,WRKY 基因都能快速而大量的表达。该试验中基因 G19 在 2 个样品中的平均表达量相差数倍,说明其是造成 2 种桉树品种不同抗性类型的重要基因。

根据荧光定量 PCR 结果,目的基因 G1、G3、G4、G5、G9、G10、G11、G18 和 G19 可能是与桉树抗枝瘿姬小蜂有关联的基因,可进一步用于定位标记和转基因利用研究。

需要特别说明的是,对于上述目的基因的具体功能,该文仅参照 BlastP 结果进行分析,今后需要采用其它的方法进行确认,如后续研究可对以上基因采取标记克隆、转基因技术以及基因沉默等手段进行其功能的诠释和验证。

(该研究是在中国林业科学研究院国家林木育种重点实验室完成的,在此对该论文做出贡献的各位老师和同学一并表示感谢。)

#### 参考文献

- [1] Mendel Z, Protasov A, Fisher N, et al. Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus* [J]. Aust J of Entomology, 2004, 43: 101-113.
- [2] Tomlin E S, Borden J H. Multicomponent index for evaluating resistance by sitka spruce to the white pine weevil [J]. Journal of Economic Entomology, 1997, 90(2): 704-714.
- [3] 陈红梅, 李昆志, 陈丽. 植物来源抗虫基因的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(11): 116-121.

- [4] 李会平, 黄大庄, 杨敏生, 等. 林木抗虫机制研究进展 [J]. 河北林果研究, 2001, 16(1): 91-96.
- [5] 王伟, 徐建民, 李光友, 等. 桉树不同无性系叶片内含物变化与枝瘿姬小蜂抗性的关系 [J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(6): 539-545.
- [6] 王伟, 徐建民, 李光友, 等. 24 个桉树品种遭受桉树枝瘿姬小蜂危害后防御酶活性变化 [J]. 中南林业科技大学学报 (自然科学版), 2012, 32(6): 55-59.
- [7] Li H P, Huang D Z, Yang M S, et al. Advance in the Study on Mechanism of Tree Resistance to insect [J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research, 2001, 16(1): 91-96 (in chinese).
- [8] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(5): 511-515.
- [9] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data [J]. Genome Biol, 2010, 11(10): 106.
- [10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [J]. Methods, 2001 (25): 402-408.
- [11] Walid EI K, Marie N, Gilles M, et al. Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(10): 2455-2469.
- [12] 王育花, 赵森, 陈芬, 等. 利用实时荧光定量 PCR 法检测转基因水稻外源基因拷贝数的研究 [J]. 生命科学研究, 2007, 11(4): 301-305.
- [13] 冯丽贞, 陈全助, 郭文硕, 等. 植物防御酶与桉树对焦枯病抗性的关系 [J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(5): 1188-1191.
- [14] 何静辉, 王丽, 贾晓琳, 等. 外源过氧化物酶提高植物抗性酶活性及可能机制分析 [J]. 河南师范大学学报 (自然科学版), 2011, 39(6): 136-139.
- [15] 许勇, 王永健, 葛秀春, 等. 枯萎病菌诱导的结构抗性和相关酶活性的变化与西瓜枯萎病抗性的关系 [J]. 果树科学, 2000, 17(2): 123-127.
- [16] 蔡青年, 张青文, 王宇, 等. 小麦体内生化物质在抗蚜中的作用 [J]. 昆虫知识, 2003, 40(5): 391-395.
- [17] Pascual J D, Feliciano A S. Terpenoids from *Juniperus sabina* [J]. Phytochemistry, 1983, 22(1): 300-301.
- [18] 祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用 [J]. 遗传, 2011, 33(11): 1191-1202.
- [19] 闫海燕, 冯瑞红, 陈利标, 等. 砂地柏中 6 种萜烯类化合物分离鉴定及其杀虫活性研究 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(1): 163-167.

## Initial Screening of Insect Resistant Gene to *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle

WANG Wei<sup>1</sup>, XU Jian-min<sup>2</sup>, LI Guang-you<sup>2</sup>, HAN Chao<sup>2</sup>, WU Shi-jun<sup>2</sup>, LU Zhao-hua<sup>2</sup>

(1. Guangzhou Institute of Landscaping Gardening, Guangzhou, Guangdong 510405, 2. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520)

**Abstract:** The high-sensitive strain of *Eucalyptus* 'DH201-2' (sample A) and high-resistant strain of *Eucalyptus urophylla* 'A107' (sample B) were chosen for transcriptome sequencing, 971 differential expression sequences were screened through de novo assembly and differential expression analysis for sequence. 19 target genes were chosen to make RT-PCR. The results showed that the target gene had a good specificity amplification except the target gene 16. The average amount of expression of G1, G5, G9, G10, G18 and G19 in sample B was significant higher than in sample A. The average amount of expression of G3, G4 and G11 in sample A was significantly higher than in sample B. There were no significant differences of the average amount of expression among the last target gene. Target gene G1, G3, G4, G5, G9, G10, G11, G18, G19 maybe the susceptibility gene to insect resistant gene to *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle.

**Key words:** *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle; insect resistant gene; transcriptome sequencing; Real-time PCR